



0420

05-01-01

PATENT

Docket No. 21295/23

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Dr. Johann Engelhardt *et al.* Group: Not Yet Assigned
Application No.: 09/826,712 Examiner: Not Yet Assigned
Filed: April 5, 2001

For: *DOUBLE CONFOCAL SCANNING MICROSCOPE*

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 on:

By:

Michelle M. Guinazzo

Date

April 27, 2001

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The above-referenced patent application claims priority, pursuant to 35 U.S.C. §119, from German Patent Application No. 100 18 256.9, filed on April 13, 2000. To perfect this claim of priority, Applicant hereby submits a certified copy of the priority application DE 100 18 256.9.

Respectfully submitted,

By:

Maria Eliseeva (Reg. No. 43,328)
Attorney for Applicants
Brown, Rudnick, Freed & Gesmer, P.C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
Tel: 617-856-8340
Fax: 617-856-8201

Dated: April 27, 2001

#2



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 18 256.9

Anmeldetag: 13. April 2000

Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Doppelkonfokales Rastermikroskop

IPC: G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 2. April 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

4211/P/050

Heidelberg, 13. April 2000/ us'

Patentanmeldung

der Firma

Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Im Neuenheimer Feld 518

69120 Heidelberg

betreffend ein

"Doppelkonfokales Rastermikroskop"

Repräsentanz Spanien
E – 03720 Benissa, Alicante
C/ Andalucia, M(2) – 56

Luisenstraße 14
D-69115 Heidelberg
Telefon +49 62 21/60 43-0
Telefax +49 62 21/60 43-60
e-mail: un@hd-patent.de

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Doppelkonfokales Rastermikroskop mit einem Beleuchtungsstrahlengang mindestens einer Lichtquelle und einem Detektionsstrahlengang mindestens eines Detektors.

Doppelkonfokale Rastermikroskope sind aus der EP 0491 289 bekannt. Bei der doppelkonfokalen Rastermikroskopie wird Licht einer Lichtquelle in zwei Teilstrahlen aufgeteilt, wobei jeder Teilstrahl mit Hilfe eines Objektivs auf einen gemeinsamen Objektpunkt fokussiert wird. Die beiden Objektive sind hierbei auf verschiedenen Seiten der ihnen gemeinsamen Objektebene angeordnet. Im Objektpunkt bzw. an der Detektionslochblende bildet sich durch die interferometrische Beleuchtung ein Interferenzmuster aus, dass bei konstruktiver Interferenz ein Hauptmaximum und mehrere Nebenmaxima aufweist. Durch die interferometrische Beleuchtung kann mit einem doppelkonfokalen Rastermikroskop im Vergleich zum konventionellen Rastermikroskop eine erhöhte axiale Auflösung erzielt werden. Im folgenden wird mit axialer Auflösung die Auflösung in Richtung der optischen Achse bezeichnet.

Die mit einem gattungsbildenden doppelkonfokalen Rastermikroskop experimentell erreichbare axiale Auflösung ist jedoch insbesondere bei Mehrfarben-Fluoreszenzanwendungen bislang geringer als die theoretisch mögliche axiale Auflösung.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein doppelkonfokales Rastermikroskop anzugeben, mit dem insbesondere bei Mehrfarben-Fluoreszenzanwendungen zumindest nahezu das theoretisch mögliche Auflösungsvermögen erzielbar ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren der gattungsbildenden Art löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein solches doppelkonfokales Rastermikroskop dadurch gekennzeichnet, dass insbesondere die optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten derart aufeinander abgestimmt sind, dass die kumulierten Abbildungsfehler bezüglich der optischen Achse und/oder mindestens einer Fläche im Objektbereich zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens sind.

Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass die Ursache der Differenz zwischen dem experimentell erreichbaren und dem theoretisch möglichen Auflösungs-

vermögen bei der doppelkonfokalen Rastermikroskopie insbesondere in den Abbildungsfehlern der im Strahlengang angeordneten Komponenten liegt. Den größten Beitrag hierzu liefern im allgemeinen die verwendeten Mikroskopobjektive, die beispielsweise einen Farblängsfehler von ca. 150 nm über einen Wellenlängenbereich von 450 nm bis 650 nm aufweisen. Allein dieser Farblängsfehler ist für sich gesehen schon größer als das theoretisch erreichbare axiale Auflösungsvermögen von ca. 100 nm.

In erfindungsgemäßer Weise werden daher die optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten derart aufeinander abgestimmt, dass die kumulierten Abbildungsfehler zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens sind. Die Summe eines Typs von Abbildungsfehlern der bei einer optischen Berechnung einzubeziehenden Komponenten bilden die kumulierten Abbildungsfehler. Das theoretisch erreichbare Auflösungsvermögen bei einem doppelkonfokalen Rastermikroskop hängt, ebenfalls wie das Auflösungsvermögen eines konventionellen Mikroskops, von der Wellenlänge des Lichts und der numerischen Apertur des verwendeten Mikroskopobjektivs ab. Bei einer typischen Fluoreszenzanwendung im biomedizinischen Bereich liegt das laterale Auflösungsvermögen eines konfokalen Rastermikroskops bei ca. 200 nm, das axiale Auflösungsvermögen beträgt ca. 600 bis 800 nm. Im folgenden wird mit lateraler Auflösung die Auflösung in der Fokalebene bezeichnet. Das laterale Auflösungsvermögen eines doppelkonfokalen Rastermikroskops ist im Wesentlichen gleich dem eines konfokalen Rastermikroskops, das axiale Auflösungsvermögen eines doppelkonfokalen Rastermikroskops liegt jedoch in einem Bereich von ca. 100 bis 200 nm. Demgemäß geben zum Erzielen eines maximalen Auflösungsvermögens die Werte des theoretischen Auflösungsvermögens eines doppelkonfokalen Rastermikroskops die Größenordnung des Abstimmbereichs der im Strahlengang angeordneten Komponenten des erfindungsgemäßen doppelkonfokalen Rastermikroskops vor. Diese Größenordnung des Abstimmbereichs kann jedoch in Abhängigkeit an die an das doppelkonfokale Rastermikroskop gestellten Anforderungen um bis zu einem Faktor 10 abweichen. Dementsprechend kann die Abstimmung der im Strahlengang angeordneten Komponenten derart erfolgen, dass die kumulierten Abbildungsfehler beispielsweise in axialer Richtung zwischen 10 und 1000 nm liegen.

Die Abstimmung der kumulierten Abbildungsfehler erfolgt hierbei bezüglich der optischen Achse und/oder bezüglich mindestens einer Fläche im Objektbereich. Hinsichtlich der Abstimmung der kumulierten Abbildungsfehler bezüglich der optischen Achse ist eine laterale Fehlerkorrektur, vorzugsweise rotationssymmetrisch, hinsichtlich der Abstimmung der kumulierten Abbildungsfehler bezüglich mindestens einer Fläche im Objektbereich ist vorzugsweise eine axiale Fehlerkorrektur vorgesehen.

Ganz allgemein handelt es sich bei der Fläche im Objektbereich um eine rechnerische Bezugsgröße. Die Fläche kann eine beliebige Form und Lage aufweisen, beispielsweise eine leicht gekrümmte Oberfläche eines Kugelabschnitts, eines Ellipsoids, eines Paraboloids oder eines hyperbolischen Paraboloids. Die Fläche könnte auch eine Ebene sein. Die Fläche könnte symmetrisch zu einer in der Fokalebene liegenden Gerade oder zur optischen Achse orientiert sein. Für unterschiedliche Typen von Abbildungsfehlern können unterschiedliche Flächen im Objektbereich vorgesehen sein.

In einer konkreten Ausführungsform stimmt die als Ebene ausgeführte Fläche im Objektbereich zumindest teilweise mit der Fokalebene der Objektive überein. Idealerweise sind die kumulierten Abbildungsfehler der im Strahlengang angeordneten Komponenten für das gesamte Bildfeld der Objektive korrigiert. Eine teilweise Übereinstimmung der Fläche im Objektbereich mit der Fokalebene der Objektive ist ebenfalls denkbar; beispielsweise kann aufgrund der Randbedingungen der optischen Berechnung eine Korrektur lediglich für einen Teil des Objektiv-Bildfelds möglich sein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind mindestens zwei zur Fokalebene symmetrisch angeordnete Flächen im Objektbereich vorgesehen. In diesem Fall könnte ein bestimmter Typ von Abbildungsfehlern bezüglich einer Fläche im Objektbereich, ein anderer Typ von Abbildungsfehlern könnte bezüglich einer anderen Fläche im Objektbereich korrigiert sein. Aufgrund der optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten ist die Anordnung der Flächen im Objektbereich im allgemeinen symmetrisch, in dieser Ausführungsform sind die Flächen vorzugsweise symmetrisch zur Fokalebene angeordnet.

Nun können zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten des Gesamtstrahlengangs berücksichtigt werden. Dies würde somit die Komponenten umfassen, die zwischen der Lichtquelle und dem Detektor im Strahlengang des Doppelkonfokalen Rastermikroskops angeordnet sind. Auch die Fehlereigenschaften der Lichtquelle und/oder des Detektors können bei der Korrektur berücksichtigt werden. Insbesondere kann das Anregungs- und/oder das Detektionsspinhole zur Korrektur genutzt werden, beispielsweise um einfache laterale und/oder axiale Versatzfehler zu kompensieren.

In einer alternativen Ausführungsform werden zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten des Strahlengangs des Interferometers berücksichtigt. Dies umfasst insbesondere den Hauptstrahlteiler, die Umlenkspiegel sowie die Objektive des Interferometers. Eine Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler der Komponenten der Teilstrahlengänge des Interferometers könnte ebenfalls vorgesehen sein. Dies wäre insbesondere dann notwendig, wenn beispielsweise die Länge der optischen Wege der Teilstrahlengänge des Interferometers unterschiedlich sind oder wenn eine optische Komponente lediglich in einem der Teilstrahlengänge des Interferometers angeordnet ist.

In besonders vorteilhafter Weise können zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten der Objektaufnahme berücksichtigt werden. Hierbei sind insbesondere die Deckgläser zu nennen, zwischen denen sich das zu detektierende Objekt befindet. So kann durch eine geeignete Wahl des Brechungsindex, der Dispersionseigenschaft und/oder der Dicke der Deckgläser die Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler des gesamten Systems begünstigt werden. Hierbei könnte die Planität der Deckgläser eine wichtige Rolle spielen, die Verwendung von Deckgläsern unterschiedlicher Eigenschaften könnte ebenfalls vorgesehen sein.

Zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler ist das Immersionsmedium zu berücksichtigen. Unter dem Immersionsmedium ist zum einen das Medium zu verstehen, das sich zwischen einem Objektiv und einem Deckglas befindet. Zum anderen ist es das Einbettmedium, das das zu detektierende Objekt direkt umgibt bzw. sich zwischen Deckglas und Objekt befindet und das Objekt gegebenenfalls fixiert. Es kann nun zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler zweckmäßig sein, die optischen Eigenschaften der beiden Immersionsmedien unterschiedlich zu

wählen, im allgemeinen wird jedoch insbesondere zur einfachen Handhabung lediglich ein Immersionsmedium verwendet werden. Als Immersionsmedium kommen sämtliche gängigen Immersionsmedien in Frage, beispielsweise Wasser, Glyzerin oder Öl.

In einer ganz besonders vorteilhafter Ausführungsform sind die kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge des Interferometers einander entgegengesetzt. Dies könnte für lediglich einen Typ von Abbildungsfehlern vorgesehen sein, eine entgegengesetzte Korrektur sämtlicher kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge des Interferometers ist ebenfalls denkbar.

Insbesondere die axialen kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge des Interferometers sind bezüglich mindestens einer zur Fokalebene der Objektive parallelen Fläche im Objektbereich einander entgegengesetzt. Diese Art der Korrektur kann an dem Beispiel des Farblängsfehlers – Bilder unterschiedlicher Farben bzw. Wellenlängen liegen an unterschiedlichen Stellen der optischen Achse – verdeutlicht werden. Der eine Teilstrahlengang mit dem ihm zugeordneten Mikroskopobjektiv weist hierbei einen kumulierten Farblängsfehler auf, bei dem die Fokalebenen für Beleuchtungslicht kürzerer Wellenlängen zwischen dem Mikroskopobjektiv und dessen rechnerischer Fokalebene liegen. Die Fokalebenen des Beleuchtungslichts der längeren Wellenlängen liegen bezüglich der rechnerischen Fokalebene des Mikroskopobjektivs auf der dem Mikroskopobjektiv abgewandten Seite. Die Korrektur des kumulierten Farblängsfehlers des anderen Teilstrahlengangs und des diesem Teilstrahlengang zugeordneten anderen Mikroskopobjektivs ist genau entgegengesetzt auszuführen, d.h. die Fokalebene für Beleuchtungslicht längerer Wellenlängen liegen bei diesem Teilstrahlengang zwischen dem Mikroskopobjektiv und der rechnerischen Fokalebene dieses Mikroskopobjektivs. Die Fokalebenen der kürzeren Wellenlängen liegen auf der rechnerischen Fokalebene dieses Mikroskopobjektivs abgewandten Seite. Da beide Teilstrahlengänge bzw. Mikroskopobjektive derart aufeinander ausgerichtet sind, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge auf einen gemeinsamen Punkt in der rechnerischen Fokalebene fokussiert, fokussiert durch die entgegengesetzte Korrektur der Komponenten der Teilstrahlengänge Licht anderer Wellenlängen jenseits der rechnerischen Fokalebene der beiden Mikroskopobjektive jeweils in einem Punkt. Demgemäß würde sich bei einer gleichzeitigen Beleuchtung dreier

unterschiedlicher Wellenlängen drei unterschiedliche Beleuchtungsfoki entlang der optischen Achse ausbilden. Hierbei wäre der Beleuchtungsfokus des Lichts der kürzeren Wellenlänge näher an dem einen Mikroskopobjektiv lokalisiert, der Beleuchtungsfokus des Lichts der mittleren Wellenlänge wäre gegebenenfalls in der gemeinsamen Fokalebene lokalisiert und der Beleuchtungsfokus des Lichts des längerwelligen Beleuchtungslichts wäre näher an dem anderen Mikroskopobjektiv lokalisiert. Die einzelnen Foki einer jeden verwendeten Beleuchtungswellenlänge beider Teilstrahlengänge müssen bei dieser Art der Fehlerkorrektur zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens übereinstimmen. Den chromatisch unterschiedlich lokalisierten Beleuchtungsfoki muss bei dem doppelkonfokalen Rastermikroskop detektorseitig Rechnung getragen werden, d.h. beispielsweise nach einer entsprechenden Farbteilung des Detektionslichts ist für jeden Beleuchtungsfokus an der konfokal korrespondierenden Stelle ein Detektionsspinnhole angeordnet.

In gleicher Weise können die lateralen kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge des Interferometers bezüglich der optischen Achse einander entgegengesetzt sein. Die entgegengesetzte Korrektur der axialen und/oder lateralen kumulierten Abbildungsfehler kann mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung während und/oder nach der Objektdetektion berücksichtigt werden. Entsprechende Entfaltungsoperationen können eingesetzt werden.

Alternativ oder zusätzlich ist zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler mindestens ein optisch adaptives Bauteil vorgesehen. Das optisch adaptive Bauteil könnte im Beleuchtungs-, im Detektionsstrahlengang oder im Interferometer des doppelkonfokalen Rastermikroskops angeordnet sein und entweder als reflektierendes oder als durchleuchtendes Bauteil ausgeführt sein. Bei dem optisch adaptiven Bauteil könnte es sich um einen phasenkonjugierten Spiegel und/oder ein LCD-Element (Liquid-Crystal-Device) und/oder einem Farb-LCD-Element und/oder einem DMD (Digital-Micro-Mirror) und/oder einem GLV (Grating-Light-Valve) und/oder einem deformierbaren Spiegel handeln.

In besonders vorteilhafter Weise kann eine von der Applikation abhängende Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler durch die Komponenten des optischen Strahlengangs erfolgen, die zur Detektion mit dem Objekt in den Strahlengang des

doppelkonfokalen Rastermikroskops eingebracht werden, also insbesondere die Deckgläser und/oder die Immersionsmedien. Dementsprechend könnte beispielsweise ein bestimmter Typ von Abbildungsfehlern durch die Komponenten des Strahlengangs des Interferometers korrigiert werden, wohingegen eine applikationsspezifische Feinabstimmung der verbleibenden Abbildungsfehler durch die jeweilige Verwendung von entsprechenden Deckgläsern erfolgen könnte. Hierdurch wäre in ganz besonders vorteilhafter Weise der Einsatzbereich eines solchen doppelkonfokalen Rastermikroskops erweiterbar. Zusätzlich oder alternativ könnte der Einsatz eines optisch adaptiven Bauteils eine vielseitige applikative Anwendung des erfindungsgemäßen konfokalen Rastermikroskops ermöglichen.

Ganz allgemein ist eine Korrektur der Bildschärfefehler und/oder der Bildmaßstabsfehler und/oder der Farbfehler der optischen Komponenten vorgesehen. Im einzelnen ist vorgesehen, dass die sphärische Aberration und/oder der Astigmatismus und/oder die Bildfeldwölbung und/oder die Verzeichnung und/oder die Koma der optischen Komponenten korrigiert ist. Die Korrektur der Farbfehler umfaßt insbesondere Farblängsfehler und/oder Farbquerfehler und/oder Farbvergrößerungsfehler. Die Korrektur der Farbfehler ist für einen Wellenlängenbereich vorgesehen, der sich von 200 nm bis 2000 nm erstrecken kann.

Neben der Fehlerkorrektur der im Strahlengang angeordneten Komponenten ist eine Abstimmung der Polarisationsseigenschaften der optischen Komponenten aufeinander vorgesehen. Durch diese Abstimmung kann eine Optimierung der Beleuchtungs- und/oder der Detektionsinterferenzmuster erzielt werden, wobei insbesondere hierdurch das Auflösungsvermögen des doppelkonfokalen Rastermikroskops erhöht werden kann. Polarisationsbeeinflussende Mittel, wie z.B. $\lambda/2$ -, $\lambda/4$ -Platten, können ebenfalls im Strahlengang vorgesehen sein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist mindestens eine optische Komponente positionierbar. Hierbei handelt es sich bevorzugt um das Detektionsspinhole, die Positionierung des Anregungsspinholes oder einer anderen Komponente im Strahlengang des doppelkonfokalen Rastermikroskops ist ebenfalls denkbar. Durch geeignete Positionierung einer entsprechenden optischen Komponente kann der gegebenenfalls noch verbleibende Restfehler der kumulierten Abbildungsfehlerkorrektur kompensiert werden.

Insbesondere zur Kompensation eines verbleibenden Farblängsfehlers ist eine Positionierung des Detektionsspinholes in axialer Richtung vorgesehen. Bei der Positionierung des Detektionsspinholes werden konstruktive Vorkehrungen getroffen, so dass bei der axialen Positionierung des Detektionsspinholes kein lateraler Versatz auftritt. Ein lateraler Versatz des Detektionsspinholes würde unter Umständen in einer Reduktion der Signalausbeute resultieren, so dass für den Fall eines unerwünschter lateralen Versatzes aufgrund der axialen Positionierung des Detektionsspinholes dieser mit einem Korrekturmittel auszugleichen ist. Dieses Korrekturmittel könnte beispielsweise ein Verschiebetisch umfassen, der das Detektionsspinhole entlang zwei Richtungen quer zur optischen Achse mit einer entsprechenden Genauigkeit bzw. Auflösung positionieren kann. Das Verkippen eines Strahlteilers oder eines Spiegels könnte zusätzlich oder alternativ einen unerwünschten lateralen Versatz des Detektionsspinholes ausgleichen.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist das Detektionsspinhole als chromatisch selektives Bauteil ausgeführt. Dieses Bauteil könnte beispielsweise aus einem durchsichtigen Substrat gefertigt sein, auf das eine Beschichtung aufgebracht ist, die nur für Licht der Wellenlänge undurchsichtig ist, für das die Blende wirken soll. Dort wo üblicherweise die Öffnung der Detektionsblende bzw. des Detektionsspinholes vorgesehen ist, ist das Substrat nicht beschichtet. Das zu detektierende Licht kann an dieser Stelle das chromatisch selektive Bauteil passieren und von einem Detektor detektiert werden.

Für jede Detektionswellenlänge bzw. für jeden Detektionswellenbereich ist in vorteilhafter Weise mindestens ein entsprechendes chromatisch selektives Bauteil vorgesehen. Jedes chromatisch selektive Bauteil wird im Detektionsstrahlengang dort angeordnet, wo der zu dem jeweiligen Detektionswellenlängenbereich bzw. zu der jeweiligen Detektionswellenlänge konfokal korrespondierende Beleuchtungsfokus lokalisiert ist. So könnten beispielsweise drei unterschiedliche chromatisch selektive Bauteile ortsfest hintereinander entlang der optischen Achse angeordnet sein, wobei eine sequentielle Detektion der verschiedenen Detektionswellenlängenbereiche möglich ist. Das bedeutet, dass zunächst mit der ersten Beleuchtungswellenlänge das Objekt beleuchtet wird für das lediglich das erste chromatisch selektive Bauteil als Detektionsspinhole wirkt. Die beiden anderen chromatisch selektiven Bauteile sind

für den ersten Detektionswellenlängenbereich nahezu transparent, so dass das zur ersten Beleuchtungswellenlänge korrespondierende Detektionslicht von dem den chromatisch selektiven Bauteilen nachgeordneten Detektor detektiert wird. Dieser ersten Detektion schließt sich eine zweite an, bei der das Objekt mit Beleuchtungslicht einer zweiten Beleuchtungswellenlänge beleuchtet wird. Das für den zweiten Detektionswellenlängenbereich korrespondierende chromatisch selektive Bauteil wirkt als Detektionspinhole für das nunmehr zu detektierende Detektionslicht, das ebenfalls von dem gleichen Detektor detektiert wird. In gleicher Weise schließt sich eine dritte Detektion des gleichen Objekts bei Beleuchtung einer dritten Beleuchtungswellenlänge an, wobei nunmehr das dritte chromatisch selektive Bauteil als Detektionspinhole für das zu der dritten Beleuchtungswellenlänge korrespondierende Detektionslicht wirkt.

Eine simultane Detektion mehrerer Detektionswellenlängenbereiche ist mit einem den chromatisch selektiven Bauteilen nachgeordneten Multibanddetektor bzw. Spektrometer möglich. Jedes chromatisch selektive Bauteil wirkt für sich gesehen als Detektionspinhole für den für ihn ausgelegten Detektionswellenlängenbereich. Daher ist nach dem Passieren der chromatisch selektiven Bauteile nur noch der konfokale Anteil des Detektionslichts sämtlicher Detektionswellenlängenbereiche vorhanden, der mittels einer spektralen Aufteilung mit anschließender Detektion mit Hilfe eines Multibanddetektors oder eines Spektrometers erfolgen kann.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die dem Patentanspruch 1 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines Ausführungsbeispiels eines erfindungsgemäßen doppelkonfokalen Rastermikroskops und

Fig. 2 eine schematische Darstellung zweier chromatisch selektiver Bauteile im Detektionsstrahlengang eines doppelkonfokalen Rastermikroskops

Die Fig. 1 zeigt ein doppelkonfokales Rastermikroskop 1 mit einem Beleuchtungsstrahlengang 2 einer Laserlichtquelle 3 und einem Detektionsstrahlengang 4 eines Detektors 5. Beleuchtungslicht der Lichtquelle 3 wird mit der Linse 6 auf das Anregungs- pinhole 7 fokussiert und von dem dichroitischen Strahlteiler 8 in Richtung der Scaneinrichtung 9 reflektiert. Das Beleuchtungslicht wird von dem Strahlteiler des Interferometers 10 in zwei Teilstrahlen aufgeteilt, die jeweils an einem Spiegel 11, 12 reflektiert werden. Das Beleuchtungslicht wird durch die beiden Mikroskopobjektive 13, 14 auf einen gemeinsamen Punkt 15 fokussiert, der in der den beiden Mikroskopobjektiven 13, 14 gemeinsamen Fokalebene 16 lokalisiert ist. Das durch die interferometrische Beleuchtung angeregte Fluoreszenzlicht des zwischen den beiden Mikroskopobjektiven 13, 14 befindlichen Objekts durchläuft den Beleuchtungsstrahlengang 2 in umgekehrter Richtung und passiert den dichroitischen Strahlteiler 8, da das Fluoreszenzlicht des Objekts eine andere Wellenlänge als das Beleuchtungslicht aufweist. Das dem dichroitischen Strahlteiler 8 nachgeordnete Detektionsspinhole 17 ist zu dem Anregungspinhole 7 konfokal konjugiert angeordnet, so dass lediglich Fluoreszenzlicht des Fokusbereichs 15 von dem Detektor 5 detektiert wird.

Erfindungsgemäß sind die optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten 6, 10, 13, 14 derart aufeinander abgestimmt, dass die kumulierten Abbildungsfehler bezüglich den Flächen 18, 19, 20 im Objektbereich zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens sind.

Die Fläche 19 stimmt über das gesamte Objektiv-Bildfeld mit der Fokalebene 16 der beiden Mikroskopobjektive 13, 14 überein. Die beiden Flächen 18, 20 sind zur Fokalebene 16 symmetrisch angeordnet. In dem Ausführungsbeispiel des in der Fig. 1 gezeigten doppelkonfokalen Rastermikroskops 1 sind zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten der Teilstrahlengänge 21, 22 des Interferometers berücksichtigt. Hierbei sind die axialen kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge 21, 22 des Interferometers bezüglich den zur Fokalebene 16 parallelen Flächen 18, 19, 20 im Objektbereich einander entgegengesetzt. Bei den axialen Abbildungsfehlern handelt es sich um den Farblängsfehler der Objektive 13,

14. Die Laserlichtquelle 3 emittiert Licht der Beleuchtungswellenlängen 488 nm, 567 nm und 647 nm. Das Mikroskopobjektiv 13 ist derart korrigiert, dass es das Licht der Beleuchtungswellenlänge 488 nm der Laserlichtquelle 3 in einen Punkt fokussiert, der in der Fläche 18 lokalisiert ist. Somit liegt der Fokus bezüglich der Beleuchtungswellenlänge 488 nm der Laserlichtquelle 3 zwischen dem Objektiv 13 und dessen Fokalebene 16. Das Objektiv 14 ist derart korrigiert, dass es – eine entsprechende Justierung vorausgesetzt – das Licht der Beleuchtungswellenlänge 488 nm der Laserlichtquelle 3 ebenfalls in einen Punkt fokussiert, der in der Fläche 18 lokalisiert ist. Demgemäß ist der Fokuspunkt des Objektivs 14 für Licht der Beleuchtungswellenlänge 488 nm der Laserlichtquelle 3 jenseits der Fokalebene 16 des Objektivs 14 lokalisiert. Das Objektiv 13 fokussiert Licht der Beleuchtungswellenlänge 647 nm der Laserlichtquelle 3 auf einen Punkt, der in der Fläche 20 im Objektbereich lokalisiert ist, der somit jenseits der Fokalebene 16 des Objektivs 13 liegt. Das Licht der Beleuchtungswellenlänge 647 nm der Laserlichtquelle 3 wird von dem Objektiv 14 in einen Punkt in der Fläche 20 im Objektbereich fokussiert, so dass der Fokus des Lichts der Beleuchtungswellenlänge 647 nm des Objektivs 14 zwischen der Fokalebene 16 und dem Objektiv 14 liegt. Der Fokus 15 beider Mikroskopobjektive 13, 14 des Lichts der Beleuchtungswellenlänge 567 nm der Laserlichtquelle 3 liegt in der Fläche 19 im Objektbereich, die mit der Fokalebene 16 übereinstimmt. Die Mikroskopobjektive 13, 14 sind derart zueinander justiert, dass die entsprechenden Foki beider Mikroskopobjektive 13, 14 in den jeweiligen Flächen 18, 19, 20 übereinstimmen. Bei simultaner Beleuchtung von Licht der drei Beleuchtungswellenlängen der Laserlichtquelle 3 ergeben sich somit drei Foki, mit denen das Objekt abgerastert wird. Die kumulierten Abbildungsfehler bezüglich der drei Flächen 18, 19, 20 im Objektbereich sind jeweils in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens, das in axialer Richtung 100 nm beträgt.

Das in der Fig. 1 gezeigte doppelkonfokale Rastermikroskop 1 ist derart ausgestaltet, dass das Detektionspinhole 17 in axialer Richtung positionierbar ist. Die dem gestrichelt eingezeichneten Teil des Detektionsstrahlengangs 4 entsprechende alternative Position des Detektionspinholes 17 ist mit dem Bezugszeichen 23 gestrichelt eingezeichnet. Bei dem gestrichelt eingezeichneten Teil des Detektionsstrahlengangs 4 handelt es sich um das der Beleuchtungswellenlänge 488

nm korrespondierende Detektionslicht. Bei der Positionierung des Detektionsspinholes 17 wird kein lateraler Versatz verursacht.

In der Fig. 2 ist ein Teil des Detektionsstrahlengangs 4 eines doppelkonfokalen Rastermikroskops schematisch dargestellt. In dem Detektionsstrahlengang 4 sind zwei Detektionsspinholes als chromatisch selektives Bauteil 24, 25 ausgeführt. Das chromatisch selektive Bauteil 24 ist mit einer Beschichtung versehen, die eine hohe Transmission für alle Wellenlängen aufweist, die kleiner als 450 nm sind, und eine geringe Transmission für alle Wellenlängen aufweist, die größer als 450 nm sind (Tiefpaßcharakteristik). In dem Diagramm aus der Fig. 2 ist die Transmissionscharakteristik 26 des chromatisch selektiven Bauteils 24 als Funktion der Wellenlänge λ gezeigt. Das Substrat des chromatisch selektiven Bauteils 24 ist an der Stelle 27 nicht beschichtet, so dass das chromatisch selektive Bauteil 24 für Licht einer größeren Wellenlänge als 450 nm als Detektionsspinhole wirkt.

Das chromatisch selektive Bauteil 25 weist eine Hochpaßcharakteristik auf, d.h. das Substrat des chromatisch selektiven Bauteils 25 ist derart beschichtet, dass die Transmission T für Licht der Wellenlängen größer als 450 nm hoch ist und für Licht der Wellenlängen kleiner als 450 nm gering ist. Das Substrat ist an der Blendenöffnung 28 nicht beschichtet, so dass das chromatisch selektive Bauteil für alle Wellenlängen, die kleiner als 450 nm sind, als Detektionsspinhole wirkt. Die Transmissionscharakteristik 29 des chromatisch selektiven Bauteils 25 ist dem anderen Diagramm der Fig. 2 entnehmbar.

Das für das chromatisch selektive Bauteil 24 als Detektionsspinhole wirkende Detektionslicht 30 sowie das für das chromatisch selektive Bauteil 25 als Detektionsspinhole wirkende Detektionslicht 31 passiert die beiden Detektionsspinholes 27, 28 und wird vom Multibanddetektor 32 simultan detektiert.

Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

Patentansprüche

1. Doppelkonfokales Rastermikroskop (1) mit einem Beleuchtungsstrahlengang (2) mindestens einer Lichtquelle (3) und einem Detektionsstrahlengang (4) mindestens eines Detektors (5),

dadurch gekennzeichnet, dass insbesondere die optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten (6, 10, 13, 14) derart aufeinander abgestimmt sind, dass die kumulierten Abbildungsfehler bezüglich der optischen Achse (33) und/oder mindestens einer Fläche (18, 19, 20) im Objektbereich zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens sind.

2. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Fläche (19) im Objektbereich zumindest teilweise mit der Fokalebene (16) der Objektive (13, 14) übereinstimmt.

3. Rastermikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei zur Fokalebene (16) symmetrisch angeordnete Flächen (18, 20) im Objektbereich vorgesehen sind.

4. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten (6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17) des Gesamtstrahlengangs zu berücksichtigen sind.

5. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten (10, 11, 12, 13, 14) des Strahlengangs des Interferometers zu berücksichtigen sind.

6. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten (11, 12, 13, 14) der Teilstrahlengänge (21, 22) des Interferometers zu berücksichtigen sind.

7. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler die Komponenten der Objektaufnahme, insbesondere die Deckgläser, zu berücksichtigen sind.
8. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler das Immersionsmedium zu berücksichtigen ist.
9. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge (21, 22) des Interferometers einander entgegengesetzt sind.
10. Rastermikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die axialen kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge (21, 22) des Interferometers bezüglich mindestens einer zur Fokalebene (16) der Objektive (13, 14) parallelen Fläche (18, 20) im Objektbereich einander entgegengesetzt sind.
11. Rastermikroskop nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die lateralen kumulierten Abbildungsfehler der einzelnen Teilstrahlengänge (21, 22) des Interferometers bezüglich der optischen Achse (33) einander entgegengesetzt sind.
12. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zur Korrektur der kumulierten Abbildungsfehler mindestens ein optisch adaptives Bauteil vorgesehen ist.
13. Rastermikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das optisch adaptive Bauteil ein phasenkonjugierter Spiegel und/oder ein LCD-Element (Liquid-Crystal-Device) und/oder ein Farb-LCD-Element und/oder ein DMD (Digital-Micro-Mirror) und/oder ein GLV (Grating-Light-Valve) und/oder ein deformierbarer Spiegel ist.
14. Rastermikroskop dadurch gekennzeichnet, dass applikationsspezifische Korrekturen nach einem der Ansprüche 7, 8, 12 oder 13 erfolgen.

15. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Bildschärfefehler und/oder die Bildmaßstabsfehler und/oder die Farbfehler der optischen Komponenten korrigiert sind.
16. Rastermikroskop nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die sphärische Aberration und/oder der Astigmatismus und/oder die Bildfeldwölbung und/oder die Verzeichnung und/oder die Koma der optischen Komponenten korrigiert ist.
17. Rastermikroskop nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Farbblänsfehler und/oder der Farbquerfehler und/oder der Farbvergrößerungsfehler der optischen Komponenten korrigiert sind.
18. Rastermikroskop nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Korrektur der Farbfehler für einen Wellenlängenbereich vorgesehen ist, der sich von 200 nm bis 2000 nm erstrecken kann.
19. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Polarisations-eigenschaften der optischen Komponenten aufeinander abgestimmt sind.
20. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine optische Komponente (17, 8) positionierbar ist.
21. Rastermikroskop nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionspinhole (17) positionierbar ist.
22. Rastermikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionspinhole (17) in axialer Richtung positionierbar ist.
23. Rastermikroskop nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die axiale Positionierung des Detektionspinholes (17) keinen lateralen Versatz verursacht.
24. Rastermikroskop nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass ein unerwünschter lateraler Versatz bei der axialen Positionierung des Detektionspinholes (17) mit einem Korrekturmittel ausgleichbar ist.

25. Rastermikroskop nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionsspinhole (17) in lateraler Richtung positionierbar ist und/oder ein Strahlteiler (8) oder ein Spiegel verkipppbar angeordnet ist.
26. Rastermikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Detektionsspinhole (17) als chromatisch selektives Bauteil (24, 25) ausgeführt ist.
27. Rastermikroskop nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass für jeden Detektionswellenlängenbereich mindestens ein entsprechendes chromatisch selektives Bauteil (24, 25) vorgesehen ist.
28. Rastermikroskop nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass dem chromatisch selektiven Bauteil (24, 25) ein Multibanddetektor (32) nachgeordnet ist.

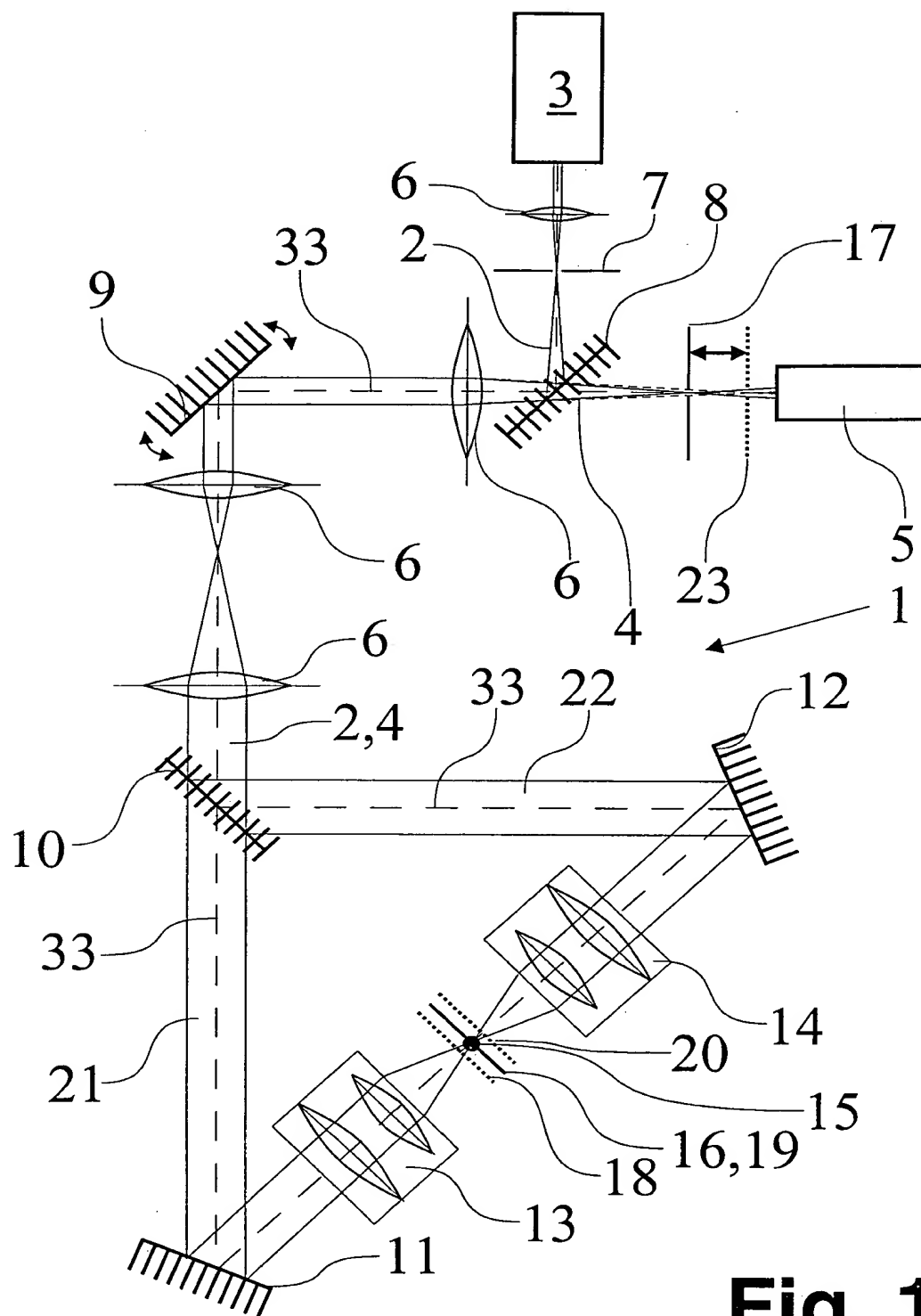


Fig. 1

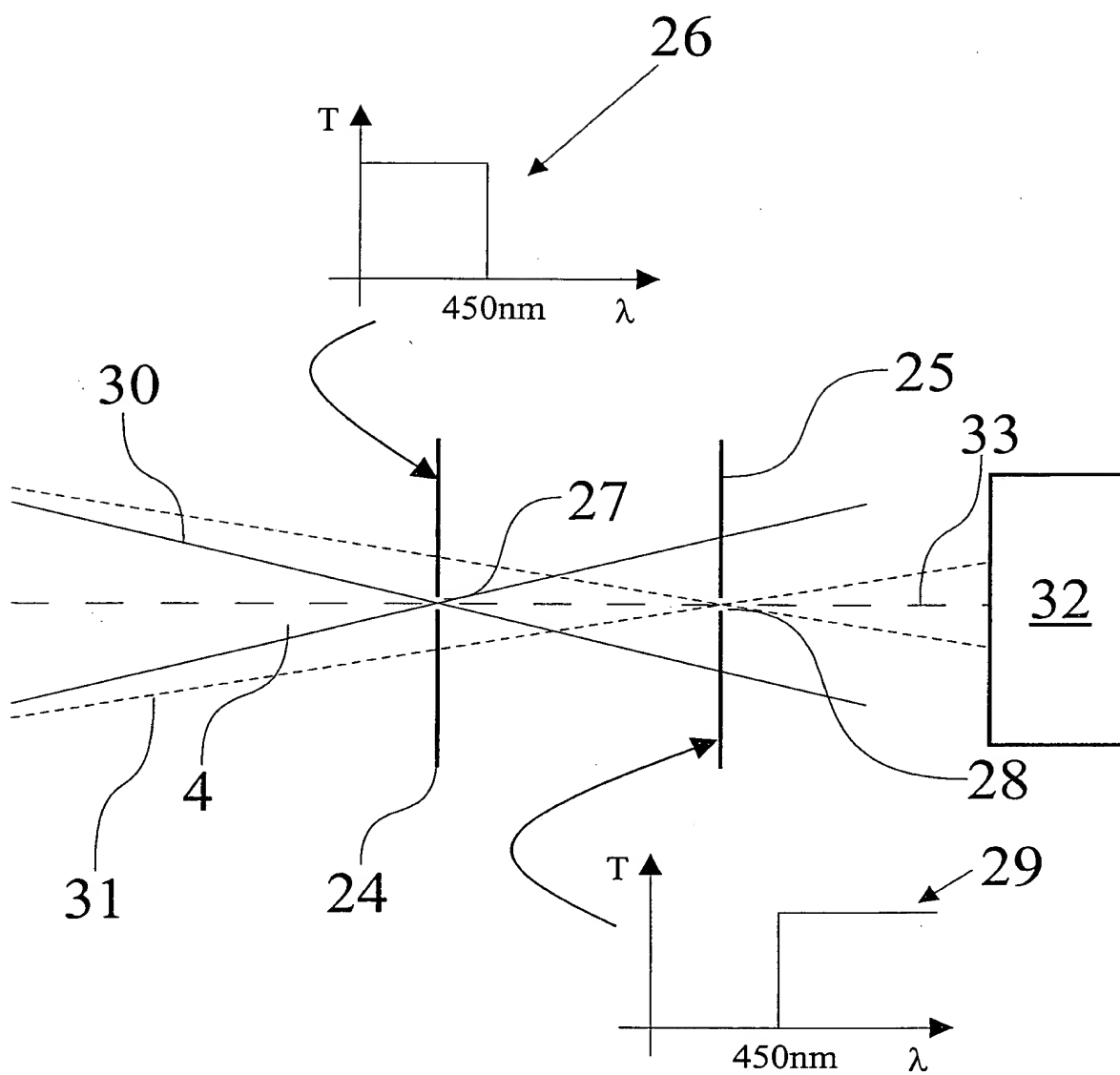


Fig. 2

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Doppelkonfokales Rastermikroskop (1) mit einem Beleuchtungsstrahlengang (2) mindestens einer Lichtquelle (3) und einem Detektionsstrahlengang (4) mindestens eines Detektors (5) und ist zum Erzielen des nahezu theoretisch möglichen Auflösungsvermögens insbesondere bei Mehrfarben-Fluoreszenzanwendungen dadurch gekennzeichnet, dass insbesondere die optischen Eigenschaften der im Strahlengang angeordneten Komponenten (6, 10, 13, 14) derart aufeinander abgestimmt sind, dass die kumulierten Abbildungsfehler bezüglich der optischen Achse (33) und/oder mindestens einer Fläche (18, 19, 20) im Objektbereich zumindest in der Größenordnung des theoretisch erreichbaren Auflösungsvermögens sind.

(Fig. 1)

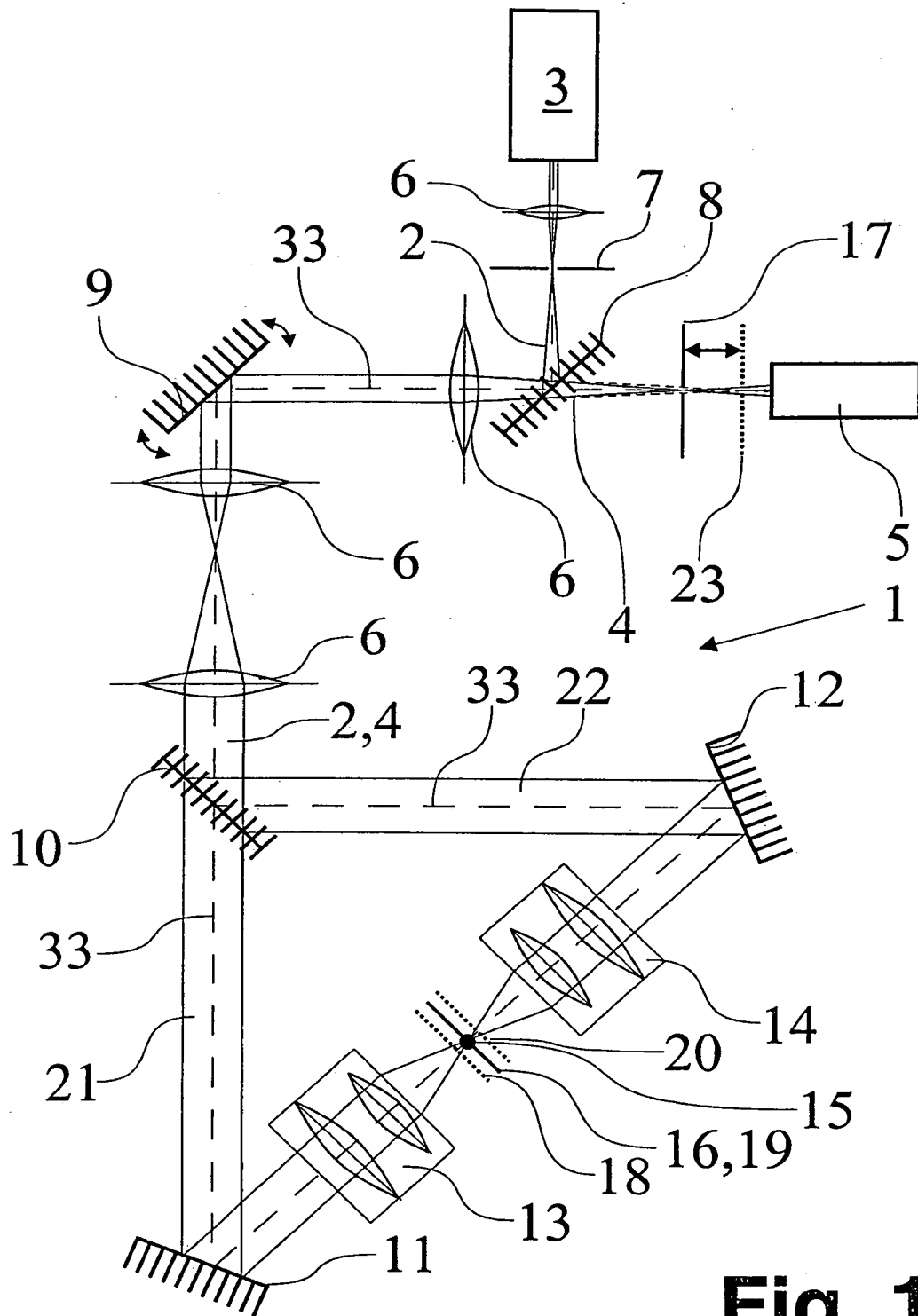


Fig. 1